

HIỆU QUẢ BẢO VỆ CỦA CHỦNG *Aeromonas* spp. NHƯỢC ĐỘC BẤT HOẠT PHÒNG BỆNH XUẤT HUYẾT TRÊN CÁ TRA

Vũ Thị Thanh Hương^{1*}, Nguyễn Mỹ Thảo Thu², Bùi Nguyễn Chí Hiếu¹, Nguyễn Đăng Quân¹, Ngô Huỳnh Phương Thảo¹

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá hiệu quả bảo vệ của chủng *Aeromonas* spp. đột biến gen *aroA* (M14 và M25) ở dạng bất hoạt trong phòng bệnh xuất huyết ở cá tra. Hai chủng vi khuẩn M14 và M25 có tiềm năng phát triển thành vắc-xin sống nhược độc đã được nghiên cứu thành công, nhưng khó khăn trong quá trình ứng dụng thực tế, bởi vấn đề an toàn sinh học trong ao nuôi. Vì vậy, 2 chủng M14 và M25 được bất hoạt bằng formalin. Hiệu quả bảo vệ của từng chủng bất hoạt trên cá tra giống bằng phương pháp ngâm ở nồng độ 10^7 CFU/mL là 73% - 100%, trong khi đó việc phối trộn đồng thời hai chủng M14 và M25 bất hoạt trong thức ăn ở nồng độ 10^8 CFU/g mang lại hiệu quả bảo vệ cá tra giống là 72%. Nghiên cứu này ghi nhận hiệu quả bảo vệ của chủng nhược độc bất hoạt tương đương với hiệu quả của chủng vi khuẩn sống nhược độc và cao hơn hiệu quả của chủng hoang dại bất hoạt khi được dùng làm vắc-xin phòng bệnh cho cá tra.

Từ khóa: Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), bệnh xuất huyết, nhược độc bất hoạt *Aeromonas* spp.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là đối tượng nuôi chủ lực của cả nước và tập trung chủ yếu ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Xuất khẩu cá tra năm 2020 đem về 1,54 tỷ USD (VASEP, 2020). Tuy nhiên, dịch bệnh phát sinh trong quy trình nuôi cá tra gây nhiều tổn thất nặng nề. Trong đó, bệnh gan thận mủ do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và xuất huyết do vi khuẩn *Aeromonas* spp. gây ra là những bệnh nguy hiểm gây chết cá hàng loạt, gây thiệt hại lớn cho người nông dân (Quyết định số 434/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ).

Đã có rất nhiều nghiên cứu về vắc-xin bất hoạt và vắc-xin nhược độc ngăn ngừa bệnh do *E. ictaluri* và *Aeromonas* spp. gây ra trên cá được công bố trên thế giới (Børgwald & Dalmo, 2019). Tại Việt Nam, công ty Pharmaq (Na Uy) đã thương mại vắc-xin ALPHA JECT[®] Panga 2 vào năm 2016. Tuy nhiên, đây là loại vắc-xin tiêm nên có khả năng gây căng thẳng cho cá, tổn nhân lực khi xử lý vắc-xin và khó sử dụng ở cá nhỏ. Vì vậy, nhóm nghiên cứu hướng đến việc tạo vắc-xin ngâm hoặc cho ăn bởi các ưu điểm như: áp dụng được cho các giai đoạn phát triển của cá, người nuôi dễ thao tác, không gây căng thẳng cho cá.

Tại Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, chủng *Aeromonas* spp. đột biến gen

có tiềm năng làm vắc-xin sống nhược độc phòng bệnh xuất huyết đã được phát triển thành công với hiệu quả bảo vệ cá tra đạt trên 78%. Mặc dù hiệu quả bảo vệ cao, nhưng việc sử dụng vắc-xin sống vào môi trường ao nuôi thủy sản còn gây nhiều lo ngại về tính an toàn sinh học, cũng như các tác động lâu dài về môi trường. Chính vì vậy, nhóm nghiên cứu khảo sát hiệu quả của các chủng nhược độc này ở dạng bất hoạt nhằm đảm bảo vấn đề an toàn sinh học khi sử dụng vắc-xin vi khuẩn trong ao nuôi thủy sản.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cá tra giống 2,5 - 3 tháng tuổi có trọng lượng 6 - 8 g. Các chủng sử dụng trong nghiên cứu bao gồm chủng *A. hydrophila*, *A. dhakensis* hoang dại (ký hiệu AGI, AGII) được phân lập tại thành phố Long Xuyên, tỉnh An Giang và chủng *A. hydrophila*, *A. dhakensis* nhược độc được tạo từ 02 chủng hoang dại trên bằng phương pháp knock-out gen *aroA* (ký hiệu M25, M14). Các chủng vi khuẩn *Aeromonas* spp. nhược độc này được kế thừa từ các nghiên cứu trước của nhóm Trương Ngọc Thùy Liên và cộng tác viên (2014); Vũ Thị Thanh Hương và cộng tác viên (2018).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tăng sinh *Aeromonas* spp. hoang dại và nhược độc

¹ Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh

² Trường Đại học Quốc tế TP. Hồ Chí Minh

* Tác giả chính: E-mail: vuthithanhhuong83@yahoo.com

Để chuẩn bị dịch vi khuẩn *Aeromonas* spp., khuẩn lạc đơn cấy từ ống giống được bảo quản -80°C , được tăng sinh trong falcon 50 mL chứa 5 mL Tryptic soy broth (TSB) qua đêm, lãc ở nhiệt độ 28°C ở tốc độ 250 rpm trong 16 h. Để tăng sinh cấp 2, 125 μL dịch nuôi cấy qua đêm được cấy chuyển vào 62,5 mL TSB (tỷ lệ 1/500) trong bình tam giác 250 mL, ở nhiệt độ và tốc độ lãc như trên. Sau 6 h, dịch tăng sinh cấp 2 được ly tâm ở 5.000 g, 20 phút và thu sinh khối, sau đó huyền phù và pha loãng đến $\text{OD}_{600} \sim 1,0$ (tương đương với mật độ 5×10^8 CFU/mL bằng dung dịch Photphase Buffer Saline (PBS) 1X. Mật độ vi khuẩn được đếm bằng cách pha loãng và nhỏ giọt trên môi trường thạch Tryptic soy agar (TSA), theo phương pháp Miles và Misra (Miles & Misra, 1931).

2.2.2. Phương pháp tạo *Aeromonas* spp. bất hoạt bằng formalin

Dịch tăng sinh cấp 2 nuôi cấy qua đêm (500 mL) được ly tâm trong bình 800 mL ở tốc độ 5.000 g, 4°C , 30 phút. Cặn được rửa bằng PBS 1X, 2 lần và huyền phù lại trong PBS 1X đến khi đạt $\text{OD}_{600\text{nm}} = 2$, tương đương mật độ 1×10^9 CFU/mL. Sau đó, dịch vi khuẩn được bất hoạt bằng formalin 40% trong 72 giờ bằng cách khuấy nhẹ ở 4°C . Trước khi bất hoạt, 100 μL dịch vi khuẩn được sử dụng để xác định mật độ bằng phương pháp nhỏ giọt. Sau 72 giờ bất hoạt, formalin trong dịch vi khuẩn được trung hòa bằng sodium metabisulphite 15%, với tỷ lệ 1/100 trong thời gian 72 giờ, khuấy nhẹ, ở 4°C . Sau 72 giờ trung hòa formalin, dịch vi khuẩn được ly tâm, thu sinh khối và rửa bằng PBS 1X, 2 lần ở tốc độ 5.000 rcf, 4°C , 30 phút. Cặn được huyền phù lại trong PBS và chỉnh về $\text{OD}_{600\text{nm}} = 2$. Cuối cùng, dịch vi khuẩn bất hoạt được trải trên đĩa TSA qua đêm, ủ ở 28°C , để kiểm tra tỷ lệ sống của vi khuẩn sau quá trình xử lý formalin (được trích dẫn từ tài liệu thứ cấp Hoare *et al.*, 2019)

2.2.3. Khảo sát liều LD_{80} của *Aeromonas* spp. hoang dại trên cá tra giống

Thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 10 cá tra giống 2,5 - 3 tháng tuổi. Cá được ngâm 30 phút trong xô dung tích 5 lít chứa dịch vi khuẩn sống. Ở thí nghiệm ngâm đơn vi khuẩn AGI hoặc AGII, gồm 3 nghiệm thức tương ứng với 3 nồng độ 1×10^6 CFU/mL, 1×10^7 CFU/mL và 1×10^8 CFU/mL. Ở thí nghiệm ngâm kép AG1 + AG2, nồng độ của mỗi chủng vi khuẩn là 5×10^5 CFU/mL, 5×10^6 CFU/mL và 5×10^7 CFU/mL.

Cá sau khi ngâm được rửa sạch và chuyển vào bể nuôi dung tích 60 lít, hàng ngày ghi nhận số cá chết (trong 14 ngày). Giá trị LD_{80} được tính dựa trên công thức tính LD_{50} của Reed và Muench (1938).

Sự hiện diện của vi khuẩn AGI, AGII trong các mẫu cá chết được kiểm tra bằng phương pháp PCR với cặp mồi AeroFd/AeroRs sử dụng để khuếch đại gen Aerolysin của *Aeromonas* với sản phẩm PCR là 209 bp (Panangala *et al.*, 2007). Tiếp theo, các chủng *A. hydrophila* AGI và *A. dhakensis* AGII được phân biệt bằng cặp mồi 2968F/2968R (Griffin *et al.*, 2013) với sản phẩm PCR là 167 bp, chỉ có *A. hydrophila* AGI trong nghiên cứu này dương tính với cặp mồi 2968F/2968R.

2.2.4. Đánh giá hiệu quả bảo vệ của M14, M25 nhược độc bất hoạt trên cá bằng phương pháp ngâm

Cá tra giống được bố trí vào bể nhựa 60 lít, mỗi bể 30 cá, tổng cộng 14 bể tương ứng với 7 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 2 lần gồm: 04 nghiệm thức ngâm ở nồng độ 10^7 CFU/mL là chủng M14 sống nhược độc; M14 nhược độc bất hoạt; M25 sống nhược độc; M25 nhược độc bất hoạt; 02 nghiệm thức không xử lý vắc-xin nhưng công độc với chủng hoang dại AGI, AGII và 01 nghiệm thức không xử lý vắc-xin, không công độc.

Cá được ngâm trong 2 lít dung dịch vi khuẩn trong 1 phút, trong khi cá đối chứng được ngâm trong nước bể trong 1 phút. Sau đó, cá được rửa qua nước sạch trước khi chuyển lại vào bể 60 lít. Các biểu hiện bệnh và tỷ lệ chết của cá được theo dõi trong 2 tuần. Sau 2 tuần ngâm M14, M25 nhược độc bất hoạt, cá được công độc bằng chủng *Aeromonas* hoang dại tương ứng: cá ngâm dịch vi khuẩn M14 nhược độc bất hoạt được công độc với chủng hoang dại AGII, cá ngâm dịch vi khuẩn M25 nhược độc bất hoạt được công độc với chủng hoang dại AGI. 30 cá ở từng bể được vớt ra ngâm với 2 lít chủng hoang dại ở liều LD_{80} trong xô 5 lít trong thời gian 30 phút, tiếp theo cá được rửa qua nước sạch và bắt trở lại bể nuôi ban đầu. Cá sau công độc được theo dõi trong 2 tuần, ghi nhận triệu chứng bệnh và tỷ lệ cá chết. Sự hiện diện của AGI, AGII trong các mẫu cá chết được kiểm tra bằng cách cấy ria tỳ tạng trên môi trường TSA và PCR với cặp mồi đặc hiệu.

Hiệu quả bảo vệ của vắc-xin được xác định thông qua phần trăm tỷ lệ sống tương đối của cá

RPS (Relative Percent Survival) được tính theo công thức của Amend (1981).

2.2.5. Đánh giá hiệu quả bảo vệ của M14, M25 nhược độc bất hoạt trên cá tra bằng phương pháp cho ăn

Hiệu quả bảo vệ của việc kết hợp hai chủng M14 và M25 nhược độc bất hoạt khi xử lý bằng phương pháp cho ăn được khảo sát trong thí nghiệm này. Đồng thời, so sánh với hiệu quả bảo vệ của hai chủng hoang dại AGI và AGII bất hoạt.

Vi khuẩn đơn có nồng độ 5×10^8 CFU/mL trộn với nhau để được dịch vi khuẩn kép M14 và M25 nhược độc bất hoạt; dịch vi khuẩn kép AGI và AGII bất hoạt ở nồng độ 1×10^9 CFU/mL, sau đó pha loãng thành các nồng độ: 2×10^8 , 2×10^7 CFU/mL và 2×10^6 CFU/mL. Mỗi nồng độ được trộn với thức ăn thủy sản theo tỷ lệ 1 mL dịch vi khuẩn trong 2 g thức ăn. Như vậy, thức ăn sau khi trộn với dịch vi khuẩn có nồng độ 1×10^8 CFU/g, 1×10^7 CFU/g và 1×10^6 CFU/g tương ứng với 03 nghiệm thức M14 và M25 nhược độc bất hoạt và 03 nghiệm thức AGI và AGII bất hoạt. Hỗn hợp thức ăn được áo dầu mực theo tỷ lệ 10 g thức ăn với 1 mL dầu mực, nhằm hạn chế sự thất thoát vi khuẩn và tăng sự hấp dẫn mùi vị đối với cá. Để tăng hiệu suất ăn của cá, cá tra giống nhện ăn một ngày trước khi cho ăn thức ăn có trộn dịch vi khuẩn. Cá được cho ăn liên tục trong 5 ngày, mỗi ngày ăn 2 lần. Nghiệm thức 7 là đối chứng dương không xử lý vắc-xin, nhưng công độc với chủng hoang dại AGI và AGII, liều LD_{80} . Nghiệm thức 8 là đối chứng âm, không xử lý vắc-xin và không công độc. Cá ở các nghiệm thức 7, 8 được cho ăn thức ăn thường. Mỗi nghiệm thức lặp lại 2 lần, tương ứng với hai bể, mỗi bể bố trí 20 cá. Tổng cộng có 8 nghiệm thức, tương ứng với 16 bể.

Vào ngày thứ 14 sau khi cho cá ăn thức ăn trộn với M14 và M25 nhược độc bất hoạt, hoặc thức ăn trộn với AGI và AGII bất hoạt, cá tra được công độc với chủng AGI và AGII hoang dại ở nồng độ LD_{80} theo phương pháp được mô tả ở mục 2.2.3. Số liệu cá sống sót sau 2 tuần công độc được xử lý thống kê bằng phần mềm PraphPad Prism 9. Với mỗi nghiệm thức, hiệu quả bảo vệ (RPS) được tính theo công thức (Amend, 1981).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 3 năm 2020 đến tháng 4 năm 2021 tại Phòng Công nghệ

sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát liều LD_{80} của chủng AGI, AGII hoang dại trên cá tra giống

Liều LD_{80} được tính cho 02 thử nghiệm hiệu quả bảo vệ của chủng M14, M25 nhược độc bất hoạt trên cá tra bằng phương pháp ngâm và hiệu quả bảo vệ của chủng M14, M25 nhược độc bất hoạt trên cá tra bằng phương pháp cho ăn lần lượt là: AGI là 2×10^7 CFU/mL; AGII là 1×10^7 CFU/mL, AGI + AGII kết hợp là 2×10^7 CFU/mL cho từng chủng. Các vi khuẩn phân lập lại từ mẫu cá chết trong thí nghiệm xác định LD_{80} của từng thử nghiệm được tiếp tục sử dụng để công độc cá tra trong các thử nghiệm chính thức.

3.2. Hiệu quả bảo vệ của chủng M14, M25 nhược độc bất hoạt trên cá tra bằng phương pháp ngâm

Các chủng M14 và M25 nhược độc bất hoạt trước khi thử nghiệm được kiểm tra không có sự hiện diện của vi khuẩn *Aeromonas* spp. hoặc vi khuẩn tạp nhiễm khác sống sót bằng cách trải trên môi trường TSA. Điều này đảm bảo sự an toàn của dịch vi khuẩn bất hoạt khi sử dụng trên cá tra.

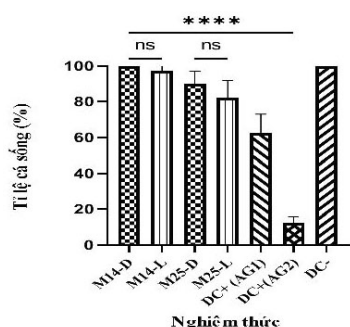
Sau công độc, cá tra bắt đầu chết từ ngày thứ 2 với các biểu hiện bệnh như xuất huyết gốc vây ngực, bụng, đuôi, phù đầu, phù mắt. Cá chết ở từng nghiệm thức được thu mẫu riêng rẽ và phân lập vi khuẩn để định danh. Kết quả PCR cho thấy các vi khuẩn phân lập được là AGI, AGII dương tính với cặp mồi AeroFd/AeroRs, 209 bp. Trong khi ở nghiệm thức cá không ngâm vắc-xin và không công độc thì cá vẫn sống khỏe mạnh.

Ở nghiệm thức ngâm chủng M14 nhược độc bất hoạt, ký hiệu M14-D, tỷ lệ cá sống là 100%; trong khi nghiệm thức ngâm chủng M14 sống nhược độc, ký hiệu M14-L, tỷ lệ cá sống là 97%, so với nghiệm thức đối chứng dương, ký hiệu ĐC+(AGII) là 13% (Hình 1). Hai nghiệm thức M14-D, M14-L không có khác biệt ở tỷ lệ cá sống khi xử lý thống kê ($p > 0,05$).

Ở nghiệm thức ngâm với chủng M25 nhược độc bất hoạt, ký hiệu M25-D, tỷ lệ cá sống là 90%; trong khi nghiệm thức ngâm chủng M25 sống nhược độc, ký hiệu M25-L tỷ lệ cá sống là 82%, so với nghiệm thức đối chứng dương, ký hiệu ĐC+(AGI) là 63% (Hình 1). Hai nghiệm thức M25-D, M25-L

không có khác biệt ở tỷ lệ cá sống khi xử lý thống kê ($p > 0,05$).

Kết quả cho thấy, khi ngâm cá với hai chủng M14, M25 nhược độc bất hoạt nồng độ 10^7 CFU/mL, hiệu quả bảo vệ (RPS) đạt được lần lượt là 100% và 73%. Trong khi đó hiệu quả bảo vệ của hai chủng M14, M25 sống nhược độc lần lượt là 97% và 53%. Như vậy, hiệu quả bảo vệ của chủng M14, M25 nhược độc bất hoạt tương đương chủng M14, M25 sống nhược độc. Đây là một phát hiện hoàn toàn mới về việc sử dụng chủng vi khuẩn nhược độc ở dạng bất hoạt để phát triển thành vắc-xin.



Hình 1. Tỷ lệ sống (%) của cá tra giống đã được ngâm với chủng M14, M25 sống nhược độc hoặc chủng M14, M25 nhược độc bất hoạt sau khi công độc

Kết quả này cho thấy hai chủng M14 và M25 nhược độc bất hoạt có khả năng bảo vệ cá tra giống trước sự xâm nhiễm của chủng hoang dại *A. dhakensis* AGII và *A. hydrophila* AGI tương tự hai chủng M14 và M25 sống nhược độc.

Hiệu quả bảo vệ của vắc-xin *A. hydrophila* bất hoạt đã được nghiên cứu rất nhiều, gần đây nhất có vắc-xin bất hoạt *A. hydrophila* trên cá chim pacu, hiệu quả bảo vệ chỉ 31,33%, ở liều LD_{50-96h} bằng phương pháp tiêm (Vaz Farias *et al.*, 2020) hoặc *A. hydrophila* bất hoạt được tạo ra bằng sóng siêu âm kết hợp các ống nano carbon đơn vách cho ra một loại vắc-xin mới SWCNTs-BL (Zhongyu Zhang *et al.*, 2020).

Xử lý vắc-xin bằng phương pháp ngâm đã chứng minh rằng các kháng nguyên sẽ được tiếp nhận qua da, mang hoặc ruột, sau đó được xử lý bởi hệ thống miễn dịch và dẫn đến bảo vệ. Phương pháp ngâm áp dụng thuận tiện cho cá nhỏ mà phương pháp tiêm gặp khó khăn (Bøgwald & Dalmo, 2019). Để tăng hiệu quả của phương pháp ngâm vắc-xin bất hoạt, các nghiên cứu gần đây đã kết hợp kháng nguyên với việc sử dụng chất kích thích miễn dịch/chất bổ trợ, tiền xử lý bằng sóng siêu âm tần số thấp, sử dụng vắc-xin DNA và vắc-xin sống giảm độc lực, làm

nhiều lỗ thủng qua da, ứng dụng các hóa chất khử hoạt tính phù hợp. Sơn tĩnh điện với chitosan tích điện dương để có được vắc-xin kết dính niêm mạc, tăng hiệu quả của vắc-xin bất hoạt (Shoemaker *et al.*, 2018) hoặc tạo những hạt khí nhỏ microbubble để tăng hiệu quả của vắc-xin ngâm (Yun *et al.*, 2019).

3.3. Hiệu quả bảo vệ của chủng M14, M25 nhược độc bất hoạt trên cá tra bằng phương pháp cho ăn

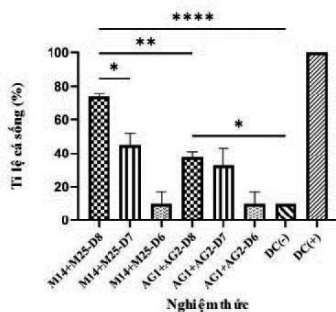
Tương tự thí nghiệm trên, sau công độc, cá bắt đầu chết từ ngày thứ 2 với các biểu hiện của bệnh xuất huyết. Cá chết ở từng nghiệm thức được thu mẫu riêng rẽ và phân lập vi khuẩn gây bệnh. Kết quả cho thấy các vi khuẩn phân lập được rất thuần và có hình dạng khuẩn lạc đặc trưng của *Aeromonas*, kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu AeroFd/AeroRs, 209 bp, cho kết quả dương tính. Trong khi ở nghiệm thức cá không ngâm vắc-xin và không công độc thì cá vẫn sống khỏe mạnh.

Sau khi công độc với chủng hoang dại AGI và AGII, ở nghiệm thức cho ăn thức ăn trộn chủng M14 và M25 nhược độc bất hoạt ở nồng độ 10^8 CFU/g, 10^7 CFU/g, 10^6 CFU/g (ký hiệu M14+M25-D8, M14+M25-D7, M14+M25-D6), tỷ lệ cá sống lần lượt là 75%; 45%, 10%, trong khi nghiệm thức đối chứng dương (ký hiệu ĐC (+)) có tỷ lệ sống là 10% (Hình 2). Sự khác biệt về tỷ lệ sống của 3 nghiệm thức M14+M25-D8, M14+M25-D7, M14+M25-D6 có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Hiệu quả bảo vệ tính được của 03 nghiệm thức này lần lượt là 72%, 39%, 0%.

Ở nghiệm thức cho ăn thức ăn trộn chủng AGI và AGII bất hoạt ở nồng độ 10^8 CFU/g, 10^7 CFU/g, 10^6 CFU/g (ký hiệu AGI+AGII-D8, AGI+AGII-D7, AGI+AGII-6) tỷ lệ cá sống lần lượt là 38%, 33%, 10%, trong khi nghiệm thức đối chứng dương, ký hiệu ĐC(+) có tỷ lệ sống là 10% (Hình 2). Sự khác biệt về tỷ lệ sống của 2 nghiệm thức AGI+AGII-D8, AGI+AGII-D7 không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Hiệu quả bảo vệ tính được của 03 nghiệm thức này lần lượt là 31%, 25%, 0%.

Như vậy, nghiệm thức cho ăn thức ăn trộn chủng AGI và AGII bất hoạt hiệu quả bảo vệ cao nhất ở 10^8 CFU/g là 31%, trong khi nghiệm thức cho ăn thức ăn trộn chủng M14 và M25 nhược độc bất hoạt là 72%. Nghiên cứu để xuất thức ăn có trộn chủng M14 và M25 bất hoạt ở nồng độ 10^8 CFU/g cho các thử nghiệm tiếp theo.

Ở kết quả đánh giá hiệu quả bảo vệ của chủng M14, M25 nhược độc bất hoạt trên cá tra bằng phương pháp ngâm (Mục 3.3) đã khẳng định được M14, M25 nhược độc bất hoạt có hiệu quả bảo vệ cao hơn M14, M25 sống nhược độc, thì ở kết quả đánh giá hiệu quả bảo vệ của chủng M14, M25 nhược độc bất hoạt trên cá tra bằng phương pháp cho ăn đã khẳng định thêm M14+M25 nhược độc bất hoạt có hiệu quả bảo vệ cao hơn chủng hoang dại AGI+AGII bất hoạt. Điều này cho thấy, 02 chủng *Aeromonas* spp. đột biến gen *aroA* có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt hơn so với 02 chủng hoang dại tương đương. Hai chủng M14 và M25 bất hoạt có tiềm năng ứng dụng làm vắc-xin khi RPS ở cả hai phương pháp xử lý bằng ngâm và cho ăn đều đạt yêu cầu của quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về thuốc thú y (QCVN 01-187: 2018/ BNNPTNT) đối với vắc-xin thủy sản bởi có tỷ lệ bảo hộ $\geq 60\%$. Việc sử dụng kết hợp 2 chủng M14, M25 phát triển thành vắc-xin nhược độc bất hoạt phòng bệnh xuất huyết cho cá tra bằng cả phương pháp ngâm và cho ăn cần được nghiên cứu và triển khai ở quy mô đồng ruộng.



Hình 2. Tỷ lệ sống (%) của cá tra giống được cho ăn thức ăn trộn hai chủng M14 và M25 nhược độc bất hoạt, AGI và AGII bất hoạt và công độc với hai chủng hoang dại AGI và AGII

Với điều kiện nuôi cá tra tại Việt Nam, bệnh xuất hiện ở tất cả các giai đoạn, vì vậy việc kết hợp xử lý vắc-xin ngâm ở giai đoạn cá bột, cho ăn ở giai đoạn cá giống là phù hợp với điều kiện thực tế. Hiệu quả của vắc-xin bằng phương pháp cho ăn chưa cao, tuy nhiên các nghiên cứu về vắc-xin cho ăn vẫn được tiến hành để tăng hiệu quả bảo vệ suốt quá trình nuôi, phải kể đến nghiên cứu về vắc-xin cho ăn phòng bệnh cho cá rô phi đỏ chống lại bệnh do vi khuẩn *Streptococcus iniae* và *A. hydrophila* (Monir et al., 2020) cũng như vắc-xin *A. hydrophila* bất hoạt trộn bột nghệ, cho cá rô phi vằn (El Tantawy & Ayoub, 2016).

IV. KẾT LUẬN

4.1. Kết luận

- Hiệu quả bảo vệ trên cá tra giống bằng phương pháp ngâm chủng *A. hydrophila* (M25) hoặc *A. dhakensis* (M14) bất hoạt ở nồng độ 10^7 CFU/mL là 73%, 100% cao hơn hiệu quả bảo vệ của các chủng này sử dụng ở dạng sống.

- Việc trộn 02 chủng M14 và M25 bất hoạt vào thức ăn cho hiệu quả bảo vệ 72% ở nồng độ 10^8 CFU/g trước sự xâm nhiễm của chủng *A. hydrophila* và *A. dhakensis* hoang dại.

- Chủng *A. hydrophila* (M25), *A. dhakensis* (M14) nhược độc bất hoạt có tiềm năng ứng dụng làm vắc-xin ngâm và cho ăn phòng bệnh xuất huyết cá tra ở quy mô ao nuôi và có thể áp dụng ở các giai đoạn phát triển khác nhau của cá.

4.2. Đề nghị

Đề nghị sử dụng chủng *A. hydrophila* (M25), *A. dhakensis* (M14) nhược độc bất hoạt phát triển thành vắc-xin ở dạng ngâm và cho ăn phòng bệnh xuất huyết cá tra ở quy mô đồng ruộng và áp dụng ở các giai đoạn phát triển khác nhau của cá.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2018. Thông tư số 10/2018/TT-BNNPTNT ngày 14 tháng 8 năm 2018 về Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia thuốc thú y - yêu cầu chung.
- Thủ tướng Chính phủ, 2021. Quyết định số 434/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ về việc phê duyệt "Kế hoạch quốc gia phòng, chống một số dịch bệnh nguy hiểm trên thủy sản nuôi, giai đoạn 2021 - 2030".
- Trương Ngọc Thùy Liên, Vũ Thị Thanh Hương, Trần Thanh Tiếng và Nguyễn Quốc Bình, 2014. Tạo chủng *Aeromonas hydrophila* đột biến nhược độc bằng phương pháp knock-out gen *aroA*. *Tạp chí Sinh học*, 36(1se): 15-21.
- Vũ Thị Thanh Hương, Nguyễn Hồng Đức, Lê Thị Thu Thảo, Ngô Huỳnh Phương Thảo và Nguyễn Quốc Bình, 2018. Hiệu quả của chủng *Aeromonas hydrophila* nhược độc sử dụng làm vắc-xin cho ăn trong phòng bệnh xuất huyết cá tra giống. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 11(96): 125-129.
- Vũ Thị Thanh Hương, 2018. Thử nghiệm hiệu quả bảo vệ của chủng *Aeromonas hydrophila* knock-out gen *aroA* phòng bệnh xuất huyết trên cá tra ở ao nuôi. Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp cơ sở.

- VASEP, 2020. *Nhiều chủng gai cho xuất khẩu cá tra*, ngày truy cập 11/8/2021. Địa chỉ: <http://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/ca-tra/nguyen-lieu/nhieu-chong-gai-cho-xuat-khau-ca-tra-20992.html>.
- Amend, D.F., 1981. Potency Testing of Fish Vaccines. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines. Developments in Biological Standardization, 49: 447-454.
- Børgwald, J., & Dalmo, R.A., 2019. Review on immersion vaccines for fish: An update 2019. *Microorganisms*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120627>
- El Tantawy, M., & Ayoub, H., 2016. Efficiency of oral *Aeromonas hydrophila* vaccine and Tumeric powder mixture on immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal for Aquaculture*, 6(1), 47-66. <https://doi.org/10.21608/eja.2016.45438>
- Griffin, M.J., Goodwin, A.E., Merry, G.E., Liles, M.R., Williams, M.A., Ware, C. & Waldbieser, G.C., 2013. Rapid quantitative detection of *Aeromonas hydrophila* strains associated with disease outbreaks in catfish aquaculture. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(4): 473-481. <https://doi.org/10.1177/1040638713494210>
- Hoare, R., Jung, S.J., Ngo, T.P.H., Bartie, K.L., Thompson, K.D., & Adams, A., 2019. Efficacy of a polyvalent injectable vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* administered to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Journal of Fish Diseases*, 42(2): 229-236. <https://doi.org/10.1111/jfd.12919>
- Miles, A.A., Misra, S.S., & Irwin, J.O., 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38(06): 732-749. DOI: 10.1017/s002217240001158x.
- Monir, M.S., Yusoff, S. bin M., Zulperi, Z. binti M., Hassim, H. binti A., Mohamad, A., Ngoo, M.S. bin M.H., & Ina-Salwany, M.Y., 2020. Haemato-immunological responses and effectiveness of feed-based bivalent vaccine against *Streptococcus iniae* and *Aeromonas hydrophila* infections in hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*). *BMC Veterinary Research*, 16(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02443-y>
- Panangala, V.S., Shoemaker, C.A., Van Santen, V.L., Dybvig, K., & Klesius, P.H., 2007. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 74(3): 199-208. <https://doi.org/10.3354/dao074199>
- Reed, L., & Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*: 493-497.
- Shoemaker, C.A., Mohammed, H.H., Bader, T.J., Peatman, E., & Beck, B.H., 2018. Immersion vaccination with an inactivated virulent *Aeromonas hydrophila* bacterin protects hybrid catfish (*Ictalurus punctatus* × *Ictalurus furcatus*) from motile *Aeromonas septicemia*. *Fish and Shellfish Immunology*, 82: 239-242. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.040>
- Vaz Farias, T.H., Arijo, S., Medina, A., Pala, G., da Rosa Prado, E.J., Montassier, H.J., Pilarski, F., & Antonio de Andrade Belo, M., 2020. Immune responses induced by inactivated vaccine against *Aeromonas hydrophila* in pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 101(October 2019): 186-191. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.059>
- Yun, S., Giri, S.S., Kim, H.J., Kim, S.G., Kim, S.W., Kang, J.W., Han, S.J., Kwon, J., Oh, W.T., Chi, C., Jun, J.W., & Chang Park, S., 2019. Enhanced bath immersion vaccination through microbubble treatment in the cyprinid loach. *Fish and Shellfish Immunology*, 91(April): 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.021>
- Zhongyu Zhang, Gaoyang Liu, Rui Ma, Xiaozhou Qi, Gaoxue Wang, Bin Zhu, Fei Ling, 2020. The immunoprotective effect of whole-cell lysed inactivated vaccine with SWCNT as a carrier against *Aeromonas hydrophila* infection in grass carp. *Fish and Shellfish Immunology*, 97(Feb): 336-343. doi:10.1016/j.fsi.2019.12.069

Efficacy of inactivated attenuated *Aeromonas* spp. against Motile aeromonas septicemia in striped catfish fingerling

Vu Thi Thanh Huong, Nguyen My Thao Thu, Bui Nguyen Chi Hieu, Nguyen Dang Quan, Ngo Huynh Phuong Thao

Abstract

The aim of this study was to evaluate the protective efficacy of *Aeromonas* spp. *aroA* mutants (M14 and M25) in the inactivated form against Motile Aeromonas Septicemia (MAS) in striped catfish fingerling. The attenuated M14 and M25 strains, potential candidates for live vaccine development, were successfully obtained from our previous studies. However, the application of these live attenuated strains in striped catfish farms are facing lots of obstacles related to the bio-safety issues. Therefore, M14 and M25 mutants were inactivated by formalin and their potential to be used as inactivated vaccines was investigated via immersion and oral routes. The inactivated M14 and M25 mutants at the

concentration of 10^7 CFU/mL provided the relative percent of survival (RPS) values ranging from 73% to 100% in striped catfish fingerlings after the immersion administration and challenge with AGI and AGII strains. Meanwhile the feed mixed with both inactivated M14 and M25 mutants at the concentration of 10^8 CFU/g gave the RPS value of 72% post the challenge. These results reported the protective efficacies generated by the inactivated attenuated *Aeromonas* spp. (M14 and M25) were similar to those obtained by the live attenuated mutants and higher than those of the inactivated wild type strains (AGI and AGII) when used as vaccines against MAS in striped catfish fingerlings.

Keywords: Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), Motile Aeromonas Septicemia, inactivated attenuated *Aeromonas* spp.

Ngày nhận bài: 30/7/2021

Ngày nhận bài: 18/8/2021

Người phản biện: TS. Đặng Thụy Mai Thy

Ngày duyệt đăng: 30/8/2021

TÍNH CHẤT VẬT LÝ VÀ HÓA HỌC CỦA ĐẤT CÁT ĐANG CANH TÁC CÂY TRỒNG CẠN Ở TỈNH QUẢNG NGÃI

Nguyễn Trường Giang^{1*}, Lê Đức Dũng¹, Vũ Văn Khuê¹

TÓM TẮT

Kết quả đánh giá tính chất vật lý và hóa học của đất cát đang canh tác cây trồng cạn được tiến hành trên địa bàn các huyện Tư Nghĩa, Mộ Đức và thị xã Đức Phổ, tỉnh Quảng Ngãi. Kết quả phân tích 42 mẫu đất được thực hiện trong năm 2018 cho thấy, đất cát ven biển đang canh tác cây trồng cạn ở tỉnh Quảng Ngãi có hàm lượng chất hữu cơ và đạm tổng số ở mức nghèo đến trung bình; K_2O tổng số ở mức nghèo, P_2O_5 tổng số dao động từ nghèo đến giàu. Đất cát ven biển đang canh tác cây trồng cạn tỉnh Quảng Ngãi bị nhiễm mặn trung bình, đất có phản ứng từ rất chua đến ít chua. Hàm lượng các kim loại nặng (Cd, As và Pb) trong đất nằm trong giới hạn cho phép.

Từ khóa: Đất cát, tính chất hóa học, tính chất vật lý, tỉnh Quảng Ngãi

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo báo cáo điều tra bổ sung và chỉnh lý bản đồ đất tỉnh Quảng Ngãi, diện tích đất cát ven biển của tỉnh là 13.183 ha và gồm 2 đơn vị đất: (i) Đất cồn cát trắng vàng (Cc) có diện tích là 4.197 ha, phân bố dọc theo bờ biển của các huyện/thị, địa hình gợn sóng và nhấp nhô; (ii) Đất cát biển (C) có diện tích là 8.986 ha, phân bố bên trong đất cồn cát trắng vàng tính từ bờ biển chủ yếu ở các huyện Mộ Đức (3.332 ha) và Đức Phổ (3.020 ha), bao gồm dạng địa hình vùn cao, bằng phẳng, không bị ngập trong mùa mưa và dạng địa hình trũng, bằng phẳng, bị ngập úng trong mùa mưa (Phân viện Quy hoạch và Thiết kế nông nghiệp miền Trung, 2005). Trong đó, diện tích đất cát ven biển đang canh tác cây trồng cạn tập trung chủ yếu ở các huyện Tư Nghĩa, Mộ Đức và thị xã Đức Phổ. Điều kiện khí hậu, thủy văn và đất cát biển phù hợp để phát triển sản xuất

các loại cây rau màu, gia vị và cây ăn quả chịu hạn có giá trị kinh tế cao.

Trong xu thế nền nông nghiệp công nghệ cao và nông sản sạch đã và đang là vấn đề tất yếu trong sản xuất, thì nền giá thể sạch và ít tồn dư của đất cát cũng là lợi thế quan trọng trong việc sản xuất rau quả theo hướng thực hành nông nghiệp tốt để tạo sản phẩm sạch hoặc tiến đến sản phẩm hữu cơ. Ngoài ra, để lựa chọn và ứng dụng các tiến bộ kỹ thuật mới vào sản xuất cây trồng cạn có hiệu quả và bền vững, cũng như làm cơ sở để xuất các biện pháp canh tác hợp lý cho vùng đất cát ven biển tỉnh Quảng Ngãi thì việc đánh giá tính chất vật lý và hóa học của đất cát đang canh tác cây trồng cạn là cần thiết.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

¹ Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Duyên hải Nam Trung bộ

* Tác giả chính: E-mail: truonggiang298@gmail.com